この添付文書をよく読んでから使用して下さい。

※2009年10月1日改訂（第2版）
2009年7月1日全面改訂（第1版）

日本標準商品分類番号
87749

体外診断用医薬品

クラスⅢ細菌検査用シリーズ

承認番号 21100AMZ00620000

ハイブリゼップ®

HYBRISEP

シリーズ構成品：核酸同定・一般細菌キット
ハイブリゼップ®「ＳＡ」　ハイブリゼップ®「ＥＦ」
ハイブリゼップ®「ＳＥ」　ハイブリゼップ®「ＥＫ」
ハイブリゼップ®「ＰＡ」

近年，SIRS（systemic inflammatory response syndrome：全身性炎症反応性症候群）なる病態概念が提唱[1]されており，「敗血症（sepsis）は感染によるSIRSである」と位置づけられつつあります[2]。SIRS患者のうち，49%が感染によるSIRS，すなわち敗血症であったとの報告があります[3]。敗血症患者の予後は不良であり，治療効果をあげるためには早期に適切な診断と治療を開始することが重要となります[2～6]。

敗血症の多岐にわたる諸症状は，細菌自身の毒力が主原因ではなく，局所的な感染に対する宿主のマクロファージ又は好中球等の応答により放出された液性因子によることが報告されています[7, 8]。ハイブリゼップは，これら好中球が細菌を貪食するという機能に着目して開発されました。

本キットは，生体内に侵入し，白血球に貪食された細菌のDNAと特異的に反応するプローブを用いて感染症の原因菌を検出するものです[9]。この方法により，抗菌薬による影響，皮膚常在菌によるコンタミネーション等の影響を受けることなく，原因菌を検出することができ，かつ迅速に（操作時間約8時間）検査結果を得ることができます。

1.全般的な注意

⑴本製品は体外診断用であり，それ以外の目的に使用しないで下さい。
⑵検査結果に基づく臨床診断は，感染フォーカス（褥瘡等）の有無を考慮し，臨床症状や血液培養法等の検査結果と合わせて担当医師が総合的に判断して下さい。
⑶添付文書以外の使用方法については保証を致しません。
⑷使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用して下さい。

2.形状・構造等（キットの構成）10回分

	容　量	貯　法
①血液分離試薬	25mL/瓶	室　温
②酵素前処理試薬（10倍濃縮液）	50mL/瓶	室　温
③酵素試薬（凍結乾燥品）	1回分/本×10	冷蔵（2～10℃）
④アセチル化試薬（10倍濃縮液）	50mL/瓶	室　温
⑤プローブ液 ハイブリゼップ「ＳＡ」 *S. aureus*に特異的なDNAプローブ ハイブリゼップ「ＳＥ」 *S. epidermidis*に特異的なDNAプローブ ハイブリゼップ「ＰＡ」 *P. aeruginosa*に特異的なDNAプローブ ハイブリゼップ「ＥＦ」 *E. faecalis*に特異的なDNAプローブ ハイブリゼップ「ＥＫ」 *E. coli, E. cloacae, K. pneumoniae* に特異的なDNAプローブ 陽性コントロール DNAプローブ 陰性コントロール DNAプローブ	50μL/チューブ	冷蔵（2～10℃）
⑥ブロッキング試薬（ウサギ正常血清）	10mL/瓶	冷蔵（2～10℃）
⑦標識抗体（50倍濃縮液）† （アルカリフォスファターゼ標識抗体溶液）	20μL/チューブ	冷蔵（2～10℃）
⑧標識抗体希釈液	1mL/チューブ	冷蔵（2～10℃）
⑨発色前処理液-1（10倍濃縮液）	50mL/瓶	室　温
⑩発色前処理液-2（10倍濃縮液）	50mL/瓶	室　温
⑪発色試薬 （ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）/5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェイト（BCIP）溶液）	10mL/瓶	冷蔵（2～10℃）
⑫対比染色液（10倍濃縮液） （ファストグリーンFCF［食用緑色3号］）	50mL/瓶	室　温
⑬洗浄液-1（20倍濃縮液）	120mL/瓶	室　温
⑭洗浄液-2（20倍濃縮液）	75mL/瓶	室　温
⑮洗浄液-3（10倍濃縮液）	100mL/瓶	室　温
⑯洗浄液-4（10倍濃縮液）	50mL/瓶	室　温
⑰3-アミノプロピルトリエトキシシラン（APS）コートスライドグラス	10枚	冷蔵（2～10℃）

† 標識抗体：ヒツジ由来ポリクローナル抗体

3.使用目的

ハイブリゼップ「ＳＡ」	末梢血における白血球中の *Staphylococcus aureus* の検出
ハイブリゼップ「ＳＥ」	末梢血における白血球中の *Staphylococcus epidermidis* の検出
ハイブリゼップ「ＰＡ」	末梢血における白血球中の *Pseudomonas aeruginosa* の検出
ハイブリゼップ「ＥＦ」	末梢血における白血球中の *Enterococcus faecalis* の検出
ハイブリゼップ「ＥＫ」	末梢血における白血球中の *Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae* の検出

※4.測定原理[9, 10]

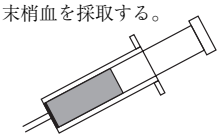
感染症においては，その生体反応システムとして，白血球等の貪食細胞が侵入細菌及び局所の感染により血中に移行した細菌を貪食します。

ハイブリゼップは，白血球中の細菌の遺伝子を見つける手段として*in situ*ハイブリダイゼーションという手法を用います。この手法は，生物の細胞や組織切片の形態を保存した状態で，特定のDNA配列を検出する技術です。

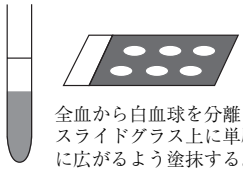
検出法の概略は次の通りです。

（1）採血

抗凝固剤を加えた末梢血を採取する。



（2）血液検体の処理



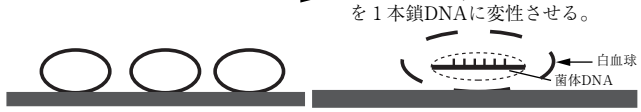
全血から白血球を分離し，スライドグラス上に単層に広がるよう塗抹する。

（3）白血球の固定

操作中に白血球が形態を保つよう固定処理を行う。

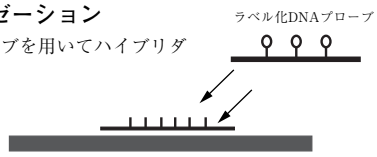
（4）前処理と細菌DNA変性

白血球細胞膜，菌体壁をDNAプローブが通過できるように前処理を行う。そして，細菌の2本鎖DNAを1本鎖DNAに変性させる。



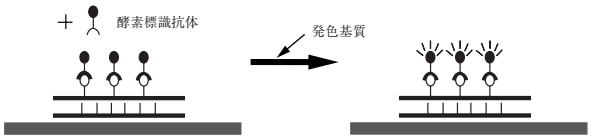
（5）ハイブリダイゼーション

それぞれのDNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行う。



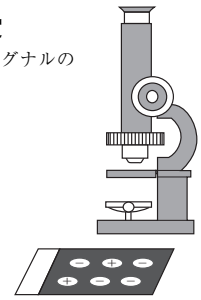
（6）免疫学的な手法によるHybrid検出

酵素免疫学的手法による発色操作を行う。



（7）光学顕微鏡判定

1,000倍の倍率で発色シグナルの有無を判定する。



※5.操作上の注意事項

⑴**検体**

・本キットの反応系には白血球数が影響するので，白血球数の少ない患者では採血量を増量して検査を行って下さい。
・無顆粒球患者では正確な検査結果が得られない場合があるので，注意して下さい。
・採取した血液には，ヘパリン等の抗凝固剤を添加して凝固を防いで下さい。
・採取した血液は，冷蔵及び冷凍しないで下さい（分画できなくなります）。

⑵**妨害物質**

・反応系にDNaseが混入すると，明確なシグナルが得られない場合があるので，操作中は手袋を着用して下さい。
・構成試薬中に汚染菌が混入すると，検出結果に影響する場合があるので注意して下さい。

⑶**測定上の注意**

・滅菌した器具を使用して下さい。
・アセチレーション試薬及び酵素試液は，用時調製して下さい。
・酵素前処理試薬は沈殿を生成することがあります。使用前によく振り混ぜて，沈殿を分散させてから調製して下さい。
・サンプルは，スライドグラスのウェル一面にむらなく塗抹して下さい。
・プローブ液は，スライドグラスのウェル一面にむらなく塗布して下さい。

※ 6.用法・用量（操作方法）

操作の一部を血液前処理装置を用いて行う場合の詳細については弊社までお問い合わせ下さい。

［器具・装置］

操作上，本キットに含まれていない次のような試薬，器具等が必要です。

（試薬）

⑴クロロホルム
⑵エタノール
⑶無水酢酸
⑷ジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）
⑸フェニルメチルスルフォニルフルオライド（ＰＭＳＦ）
⑹ホルムアミド
⑺氷酢酸
⑻5mol／L塩酸
⑼5mol／L水酸化ナトリウム
⑽滅菌精製水

（器具）

⑴冷却低速遠心機（140G～180Gで使用できるもの）
⑵恒温器（37～42℃で使用できるもの）
⑶血球計算盤
⑷振とう機
⑸湿潤箱
⑹恒温槽（42℃で使用できるもの）
⑺光学顕微鏡
⑻チップ式ピペット（5μL～1,000μL）

（滅菌器具）

⑴遠心管
⑵チップ
⑶ピペット（10mL）
⑷染色瓶（50mL）
⑸メスシリンダー（150mL）
⑹注射筒（1mL）
⑺0.2μmシリンジトップフィルター

［試薬の調製法］

50mL染色瓶を用いた場合の操作1回あたりの試薬調製

⑴ＰＢＳ
洗浄液－1：滅菌精製水（6mL：114mL）の割合で混合して下さい。

⑵カルノア固定液
エタノール：クロロホルム：酢酸（30mL：15mL：5mL）の割合で混合して下さい。

⑶酵素前処理試薬
沈殿を生成することがあります。使用前によく振り混ぜて，沈殿を分散させてから，酵素前処理試薬：滅菌精製水（5mL：45mL）の割合で混合して下さい。

⑷酵素試液（用時調製）
酵素試薬1バイアルに酵素試薬溶解液1mLを加えて溶解して下さい（スライドグラス1枚分）。
酵素試薬溶解液：
1. PMSF　1mgにつきDMSO　50μLの割合で溶解して下さい。
2. 上液50μLをＰＢＳで5mLに調製して下さい。

⑸0.2mol/L塩酸含有ＰＢＳ
洗浄液－1：5mol/L塩酸：滅菌精製水（2.5mL：2mL：45.5mL）の割合で混合して下さい。

⑹アセチレーション試薬（用時調製）
アセチル化試薬：滅菌精製水（5mL：44.6mL）の割合で混合して下さい。
使用直前にこの溶液に無水酢酸0.4mLを加え，よく混合して下さい。

⑺70mmol/L水酸化ナトリウム含有ＰＢＳ
洗浄液－1：5mol/L水酸化ナトリウム：滅菌精製水（2.5mL：0.7mL：46.8mL）の割合で混合して下さい。

⑻ハイブリダイゼーション洗浄液（50mL×3回分）
洗浄液－2：ホルムアミド：滅菌精製水（7.5mL：75mL：67.5mL）の割合で混合して下さい。本液はあらかじめ42℃で保温してから使用して下さい。

⑼標識抗体液
標識抗体：標識抗体希釈液（2μL：98μL）の割合で混合して下さい（1検体分）。

⑽発色前処理液
発色前処理液－1：発色前処理液－2：滅菌精製水（5mL：5mL：40mL）の割合で混合して下さい。

⑾洗浄液－3（50mL×2回分）
洗浄液－3：滅菌精製水（10mL：90mL）の割合で混合して下さい。

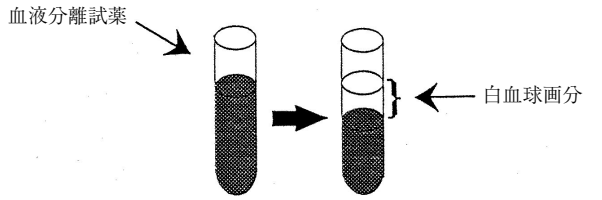
⑿洗浄液－4及び対比染色液
上記試薬又は溶液：滅菌精製水（5mL：45mL）の割合で混合して下さい。

⒀1％酢酸溶液
氷酢酸：滅菌精製水（0.5mL：49.5mL）の割合で混合して下さい。

［操作法］

［1］採血・血液検体の処理

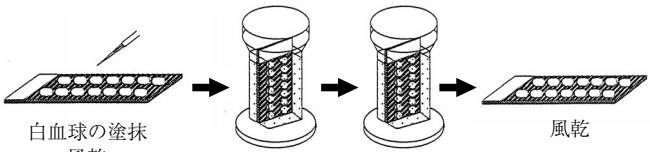
⑴採血
ヘパリン等の抗凝固剤を加えた末梢血を5mL採取して下さい。白血球数が少ないときは，採血量を10mLに増やして下さい。
⑵白血球画分の採取
①血液に血液分離試薬を４：１の割合で加えて，混和して下さい。
②37℃で30分間静置し，白血球画分を採取して下さい。



⑶白血球の採取
①白血球画分を４℃，140Ｇ～180Ｇで10分間遠心分離して白血球を沈殿させます。
②溶血操作
赤血球が混入した場合は，白血球のペレットに滅菌精製水１mLを加えて懸濁し，直ちに過剰量のＰＢＳ[調製法(1)]を加えて等張化した後，再度，４℃，140Ｇ～180Ｇで10分間遠心分離して下さい。

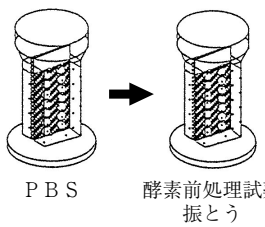
［２］白血球の固定

⑴白血球懸濁液の調製
白血球のペレットに少量のＰＢＳを加えて懸濁し，血球計算盤を用いて白血球数を計測して下さい。目安として，白血球数4,000～6,500／μLの血液５mLの場合，ＰＢＳ200μLに懸濁して下さい。
⑵カルノア固定
①細胞数が1×10^4～5×10^4個／μLとなるようにして調整した白血球懸濁液５μLを，ＡＰＳコートスライドグラスの各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹し，完全に風乾して下さい。
②カルノア固定液[調製法(2)]に20分間浸して下さい。
③75%エタノール液に５分間浸し，完全に風乾して下さい。



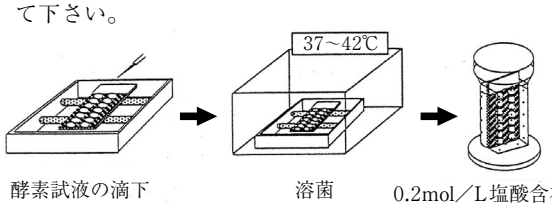
［３］白血球細胞膜の透過性亢進処理（白血球細胞外膜の破壊）

⑴ＰＢＳに10分間浸して下さい。
⑵界面活性剤処理
酵素前処理試薬[調製法(3)]に浸し，そのまま振とう機上で10分間振とうして下さい。



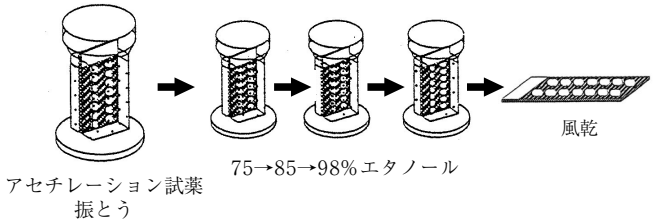
［４］菌体壁の溶菌酵素処理（細菌ＤＮＡの露出）

⑴湿潤箱中で，スライドグラス１枚につき酵素試液[調製法(4)]１mLを検体塗抹部位に滴下し，ふたをして37～42℃のインキュベーター中で30分間静置して下さい。
⑵傾斜法にて酵素試液を除去した後，0.2mol／L塩酸含有ＰＢＳ[調製法(5)]に浸し，そのまま振とう機上で10分間振とうして下さい。



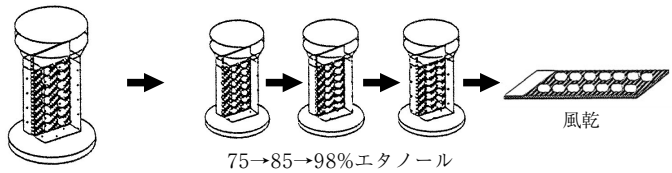
［５］細胞膜蛋白質のアセチル化

⑴スライドグラスをアセチレーション試薬[調製法(6)]に浸し，そのまま振とう機上で10分間振とうして下さい。
⑵75→85→98%エタノールに順次３分間ずつ浸し，完全に風乾して下さい。



［６］菌体ＤＮＡのアルカリ処理（２本鎖ＤＮＡを１本鎖に変性）

⑴70mmol／L水酸化ナトリウム含有ＰＢＳ[調製法(7)]に３分間浸して下さい。
⑵75→85→98%エタノールに順次３分間ずつ浸し，完全に風乾して下さい。



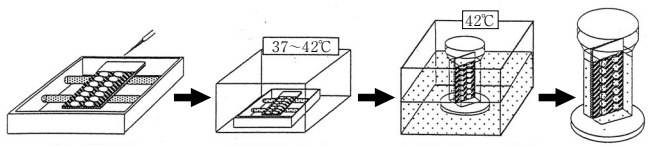
70mmol／L水酸化ナトリウム含有PBS

［７］プローブの熱処理（２本鎖ＤＮＡを１本鎖に変性）

使用するプローブ液を約１分間煮沸後，直ちに氷中に浸すことにより急冷して下さい。

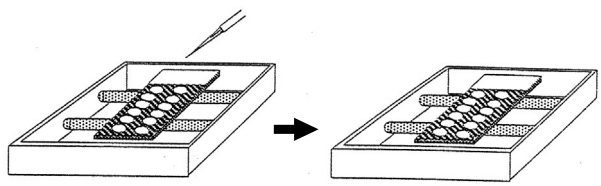
［８］ハイブリダイゼーション

⑴検体を塗抹したウェルに７種類の各プローブ液を５μL塗布して下さい。
⑵スライドグラスを湿潤箱に入れふたをして37～42℃のインキュベーター中で２時間静置して下さい。
⑶ハイブリダイゼーション洗浄液[調製法(8)]を３つの染色瓶に入れ，42℃の恒温水槽中で予備保温し，それらにスライドグラスを順次10分間ずつ（３回）浸して下さい。
⑷ＰＢＳに浸し，そのまま振とう機上で10分間振とうして下さい。



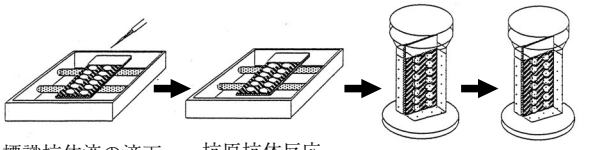
［９］ブロッキング

湿潤箱中で，スライドグラス１枚につきブロッキング試薬１mLを検体塗抹部位に滴下し，ふたをして室温にて30分間静置して下さい。



［10］標識抗体との反応

⑴ブロッキング試薬を傾斜法にて除去した後，標識抗体液[調製法(9)]を検体塗抹ウェルに10μLずつ滴下し，30分間静置して下さい。
⑵洗浄液－３[調製法(11)]を２つの染色瓶に入れ，スライドグラスを浸し，そのまま振とう機上で順次10分間振とうして下さい。（２回）
⑶発色前処理液[調製法(10)]に浸し，そのまま振とう機上で10分間振とうして下さい。

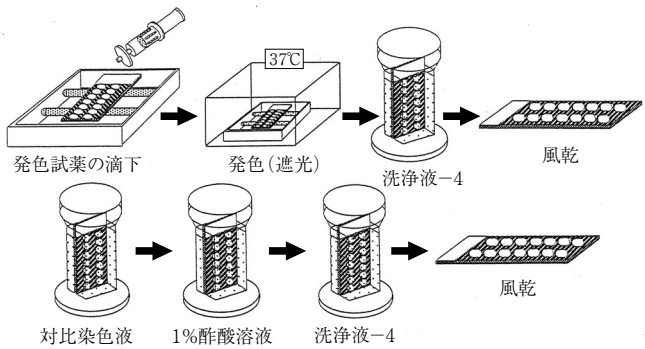


［11］検出

⑴湿潤箱中で，スライドグラス1枚につき発色試薬1mLを0.2μmシリンジトップフィルターを装着したディスポーザブルシリンジでろ過し，スライドグラスの検体塗抹部位に滴下し，37℃のインキュベーター中で30分間，遮光して静置して下さい。

⑵洗浄液−4 調製法(12)に5分間浸して，風乾した後，対比染色液調製法(12)に1分間浸し，次いで1％酢酸溶液調製法(13)に数秒浸して下さい。

⑶洗浄液−4に数秒浸して余分の対比染色液を洗い流し，完全に風乾して下さい。



7.測定結果の判定法

光学顕微鏡で鏡検（×1,000）するとき，1ウェル中，対比染色液により淡青色に染まった細胞中において青紫色の発色が1つでも認められた場合，陽性とします。

［参考］[11]

敗血症が疑われた292症例について本法と血液培養法を比較実施した臨床試験において，ハイブリゼップ（「SA」，「SE」，「PA」，「EF」，「EK」）による試験結果が陽性であった症例は123症例（42%），血液培養法32症例（11%）であり，ハイブリゼップでは血液培養法に比較して約4倍の陽性率を示しました。

さらに，ハイブリゼップではほとんどの症例において検査結果を翌日に報告しており，一方血液培養法では翌日から2週間の幅があり，迅速性にも優れているとの評価を得ています。

ハイブリゼップでの検出率

全　症　例	陽性症例数	陽　性　率
292	123	42.1%

8.性能

⑴感度試験

本シリーズ品に対応する各種細菌の貪食サンプルを用い，［操作法］に従い試験するとき，シグナルを検出できる。

⑵正確性試験

各種細菌の貪食サンプルを用い，［操作法］に従い試験するとき，本シリーズ品に対応する貪食サンプルにのみ，シグナルを検出する。

⑶同時再現性試験

特異性試験を同時に3回繰り返し試験するとき，得られる結果は同一である。

9.使用上又は取扱い上の注意

［取扱い上の注意］

⑴採取した血液は，感染性を有するものとして，施設の安全規定に従って取扱って下さい。

⑵検体は，HIV，HBV，HCV等の感染の恐れがあるものとして，検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し，また口によるピペッティングを行わないで下さい。

⑶試薬が誤って目や口に入った場合には，水で十分洗い流す等の応急処置を行い，必要があれば医師の手当てを受けて下さい。

［使用上の注意］

⑴添付文書に記載された操作法に従って検査して下さい。
［記載された操作法で操作しない場合，正しい結果が得られません。］

⑵試薬の開封後は，なるべく早く使用し，保存する場合は蓋をしめて，指定の貯蔵方法で保存して下さい。

⑶誤って凍結させた試薬は，品質が変化して正しい結果が得られないことがあるので使用しないで下さい。

⑷使用期限を過ぎた試薬を使用しないで下さい。

［廃棄上の注意］

⑴本シリーズ品のブロッキング試薬には，防腐剤として0.08％のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは，鉛管，銅管と反応して爆発性の金属アジドを生成することがありますので，廃棄する場合は，大量の水と共に流して下さい。

⑵検体に接触した器具，試薬及び試薬容器等は感染の危険があるものとし，オートクレーブ（121℃，30分以上）等で滅菌処理するか，「感染性廃棄物処理マニュアル」に従って処理して下さい。

⑶使用後の容器は，焼却処理するか，廃棄する場合には「医療廃棄物処理ガイドライン」に従って処理して下さい。

10.貯蔵方法・有効期間

貯蔵方法　　冷蔵試薬：2～10℃，その他の試薬：室温保存
有効期間　　12カ月
＊使用期限は，外装に記載してあります。

11.包装単位

10回検査分キット　（冷蔵試薬セット／室温試薬セット）
補充試薬

12.主要文献

1）Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee., Crit. Care Med., **20**, 864（1992）
2）松本哲哉　ほか：Medical Technology, **27**, 1372（1999）
3）相川直樹　ほか：医学のあゆみ, **181**, 8（1997）
4）平澤博之：医学のあゆみ, **181**, 3（1997）
5）高安　聡　ほか：医学のあゆみ, **181**, 96（1997）
6）相川直樹　ほか：日本臨床，別冊（感染症症候群Ⅰ），241（1999）
7）平澤博之：日本救急医学界雑誌, **5**, 225（1994）
8）平澤博之：外科治療, **72**, 211（1995）
9）大野典也：医学検査, **41**, 1347（1999）
10）松久明生　ほか：BIO Clinica, **14**, 97（1999）
11）Shimada, J, et al., J. Infect. Chemother., **5**, 21（1999）

［問い合わせ先］扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター　学術部門
〒536-8523 大阪市城東区森之宮二丁目3番30号
TEL 06-6964-2763　FAX 06-6964-2706
（9:00～17:30/土日祝日を除く）

製　造　販　売　元
扶桑薬品工業株式会社
大阪市城東区森之宮二丁目3番11号

UM･115･115E